

栀子花提取物的制备工艺优化及其抗氧化活性研究

徐 祯¹, 毛春芹^{1,2}, 顾 薇^{1,2}, 毛 靖¹, 苏联麟¹, 李 林¹, 皮文霞^{1*}, 陆兔林^{1,2*}

¹南京中医药大学; ²江苏省中医外用开发与应用工程研究中心, 南京 210023

摘要: 栀子花作为化妆品原料具有较好的开发前景, 但由于对其研究较少导致其开发受限。本研究通过单因素考察和正交试验对栀子花精油 (*Gardenia jasminoides* flower essential oil, GJFEO) 的超临界 CO₂ 萃取工艺和残渣中的栀子花总黄酮提取物 (*Gardenia jasminoides* flower flavonoids extract, GJFFE) 的乙醇超声提取工艺进行优化; 将得到的 GJFEO 和 GJFFE 按照质量比 1:24 复配得到栀子花复合提取物 (*Gardenia jasminoides* flower compound extract, GJFCE)。之后采用体外细胞实验, 分别考察了 GJFEO、GJFFE 和 GJFCE 的抗氧化活性。结果表明: 优化后的 GJFEO 萃取工艺为萃取温度 38 °C、萃取压力 32 MPa、分离压力 12 MPa; GJFFE 的萃取工艺为乙醇浓度 50%、液料比 25:1、提取 2 次、每次 50 min。三种提取物对氧化损伤的人角质细胞均有保护作用, 且 GJFCE 的抗氧化活性优于单一使用的 GJFEO 和 GJFFE ($P < 0.001$)。本研究为栀子花的深加工及其在化妆品领域的开发提供技术支持和理论依据。

关键词: 栀子花; 精油; 总黄酮; 超临界流体萃取法; 抗氧化

中图分类号: TQ658.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)10-1720-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.10.012

Study on the optimization of the preparation technology of *Gardenia jasminoides* flower extract and its antioxidant activity

XU Zhen¹, MAO Chun-qin^{1,2}, GU Wei^{1,2}, MAO Jing¹, SU Lian-lin¹, LI Lin¹, PI Wen-xia^{1*}, LU Tu-lin^{1,2*}

¹Nanjing University of Chinese Medicine; ²Jiangsu Engineering Research Center for Development and Application of Traditional Chinese Medicine for External Use, Nanjing 210023, China

Abstract: *Gardenia jasminoides* flower has a good prospect as a raw material for cosmetics, but its development is limited due to the lack of research on it. In this study, the supercritical CO₂ extraction process of *Gardenia jasminoides* flower essential oil (GJFEO) and the ethanol ultrasonic extraction of *Gardenia jasminoides* flower flavonoids extract (GJFFE) in the residue were optimized through single factor investigation and orthogonal experiment. The *Gardenia jasminoides* flower compound extract (GJFCE) was then obtained by the mixture of GJFEO and GJFFE in proportion (mass ratio = 1:24). Afterwards, the antioxidant activities of GJFEO, GJFFE and GJFCE were investigated by cell experiments *in vitro*. The results showed that the optimal extraction process for GJFEO was as follows: extraction temperature of 38 °C, extraction pressure of 32 MPa, separation pressure of 12 MPa. The optimal extraction process for GJFFE was as follows: ethanol concentration of 50%, ratio of liquid to material of 25:1, extraction twice, extraction time of 50 minutes. The three extracts had protective effects on HaCaT cells damaged by oxidation, and the antioxidant activity of GJFCE was better than that of GJFEO or GJFFE alone ($P < 0.001$). This research provides technical support and theoretical basis for the deep processing of *Gardenia jasminoides* flower and its development in the field of cosmetics.

Key words: *Gardenia jasminoides* flower; essential oil; total flavonoids; supercritical fluid extraction; anti-oxidation

栀子花是茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 和重瓣栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis var. *fortu-*

niana (Lindl.) Hara 的干燥花, 收录于《中华本草》^[1]《中药大辞典》^[2]等书籍, 其味苦、性寒, 入药具有清肺止咳、凉血止血的作用。栀子花食用、药用、妆用历史悠久, 《滇南本草》^[3]言其可“止肺热咳嗽, 止鼻衄血, 消痰”; 《千金翼方》^[4]《本草纲目》^[5]均称其可“悦颜色”。现代研究表明栀子花含有精油、三萜

收稿日期: 2021-07-12 接受日期: 2021-09-16

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1701900); 江苏省研究生科研与实践创新项目 (SJCX21_0686)

* 通信作者 Tel: 86-013851661809; E-mail: 300017@njucm.edu.cn, ltl2021@njucm.edu.cn

类、黄酮类、酚酸类、生物碱类等多种成分^[6-8]。梔子花气味芳香,从中提取的精油具有舒缓身心、抗焦虑^[9]等作用,但因含量少、难以提取而极其珍贵;研究表明梔子花及其精油能够清除多种自由基^[6,10],具有良好的抗氧化美容效果。黄酮类物质是具有较强抗氧化功效的植物活性成分。梔子花与常用中药材梔子来自同一植物,种植广泛、资源丰富,其提取物目前已收录于《化妆品已使用原料目录》2021年版中,但由于研究较少,国内对梔子花的利用率不高,也造成了梔子花资源的大量浪费。

植物精油的传统提取方法为水蒸气蒸馏法,这种方法设备简单,但提取率低,容易导致提取的精油香味不纯正^[11]。超临界 CO₂ 萃取法^[12,13]是一种以 CO₂ 流体为溶剂、从混合物中分离出组分的提取方法,这种方法与水蒸气蒸馏法相比提取效率高,能够更加有效保存精油的天然香味,且 CO₂ 可回收、无毒,不会产生浪费和污染。有文献报道^[12],采用这种提取方法得到的梔子花精油没有受到水蒸气的高温影响,一些易挥发的芳香成分保留了下来,具有鲜梔子花的特征香气。除此之外,也有研究^[14,15]对梔子花中黄酮类成分的提取工艺进行了考察。由于精油和黄酮都是植物中生物活性较强的大类成分,且应用范围广泛,将这两种成分进行综合提取在多种中药和含有精油的植物中已有应用,如紫花地丁^[16]、枇杷花^[17]、玫瑰^[18]、薰衣草^[19]等。目前对梔子花精油(*Gardenia jasminoides* flower essential oil, GJFEO)或梔子花总黄酮类提取物(*Gardenia jasminoides* flower flavonoids extract, GJFFE)的提取均为以梔子花为原料进行单一提取,对梔子花展开综合性深加工研究,可以提高梔子花的利用率,为中药非药用部位资源的开发利用提供参考。

经文献报道,GJFEO在体外化学实验中对DPH、ABTS及OH自由基都有较好的清除作用^[6,10],植物黄酮也是天然抗氧化活性成分研究中的一大热点^[20]。目前梔子花细胞水平和动物水平的抗氧化活性研究较少,对梔子花进行更深入的药理活性研究可以为相关抗氧化化妆品及日用产品的开发提供技术支持和理论依据。本研究将对梔子花中精油和总黄酮成分的综合提取工艺进行优化,并对梔子花的抗氧化活性进行研究,以期解决以上问题,并为中药非药用部位的综合利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

梔子花购买自浙江温州,批号20200520,干燥方式为阴干。经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥花。

芦丁(上海源叶生物科技有限公司,纯度98%,批号YM0313SA14);没食子酸对照品(国药集团化学试剂有限公司,纯度99%,批号20200408);福林酚试剂(国药集团化学试剂有限公司);十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)(国药集团化学试剂有限公司);噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)(美国Sigma-Aldrich公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(上海九亿化学试剂有限公司);DMEM培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司);胎牛血清(美国Invigentech公司);青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司);无菌PBS(博士德生物科技有限公司);胰蛋白酶-EDTA消化液(北京索莱宝科技有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FW80型高速万能粉碎机(天津布泰斯特仪器有限公司);FA1104型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);DY221-50-06型超临界CO₂萃取装置(海安宏麦机械有限公司);HH-S4型恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);TU-1901型双光束紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);KQ-500E型医用超声清洗器(昆山超声仪器有限公司);SW-CJ-1F型洁净工作台(苏州苏净化设备有限公司);3131型二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技有限公司);细胞培养板(美国Corning公司);CKX31型显微镜(南京奥力科学仪器有限公司);Infinite M200PRO型酶标仪(瑞士TECAN公司)。

1.3 细胞株

人永生角质形成(HaCaT)细胞(上海富衡生物科技有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 梔子花精油的提取工艺研究

1.4.1.1 单因素试验

本研究首先采用超临界CO₂流体萃取法对梔子花进行提取,该方法不仅提取率高、经济环保,且方便梔子花残渣的进一步提取利用。参数设置参考

相关文献^[12],以精油得率为指标,分别对萃取温度(30、35、40、45 ℃)、萃取压力(15、20、25、30、35 MPa)、分离压力(8、10、12、14 MPa)进行单因素考察。将干栀子花粉碎后过 50 目筛,取 100 g 栀子花粉末装入超临界流体萃取装置,设置萃取温度、萃取压力、分离压力,分离温度为 35 ℃,萃取 1 h 后打开

分离釜阀门收集 GJFEO。

1.4.1.2 正交试验

在单因素实验结果的基础上,对超临界 CO₂ 萃取法萃取 GJFEO 的工艺进一步优化,因素水平考察指标如表 1 所示。

表 1 GJFEO 提取工艺正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels analysis of orthogonal test of GJFEO extraction process

水平 Level	A 萃取温度 Extraction temperature(℃)	B 萃取压力 Extraction pressure(MPa)	C 分离压力 Separation pressure(MPa)
1	38	28	12
2	40	30	14
3	42	32	16

1.4.2 栀子花总黄酮提取物的提取工艺研究

1.4.2.1 总黄酮标准曲线的绘制

总黄酮的显色及测定参考文献方法^[14]。精密吸取质量浓度为 100.1 μg/mL 的芦丁对照品溶液 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mL,分别加入到 10 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇 2 mL,混匀,加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL,混匀静置 5 min,再加入 10% 硝酸铝 0.3 mL,混匀静置 6 min,加入 4% 氢氧化钠 4 mL,混匀静置 15 min,用 70% 乙醇定容至刻度,摇匀;用同样的方法制备空白对照。在 507 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),进行线性回归。

1.4.2.2 单因素试验

收集萃取精油后的栀子花粉末残渣提取其中的总黄酮类物质可提高栀子花的利用率。本研究参考相关文献^[15],以乙醇为溶剂对栀子花残渣进行超声提取,以总黄酮提取率为指标,对乙醇浓度(50%、60%、70%、80%)、液料比(10:1、15:1、20:1、25:1)、提取时间(20、30、40、50 min)、提取次数(1、2、3次)进行单因素考察,确定 GJFFE 的最佳提取工艺。GJFFE 的提取步骤如下。

称取提取完精油的栀子花粉末残渣 10 g,加入不同浓度乙醇超声(功率 500 W,频率 40 kHz)提取,合并提取液,过滤后得到滤液,浓缩至 50 mL 得到栀子花总黄酮提取液,提取液蒸干可得到浸膏,即为 GJFFE。GJFFE 用 50% 乙醇溶解后定容至 50 mL,参照“1.4.2.1”中总黄酮的显色方法进行显色和测定,总黄酮的提取率计算公式见式(1):

$$\text{总黄酮提取率} = \frac{\text{总黄酮含量} \times \text{浸膏质量}}{\text{栀子花残渣质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4.3 栀子花复合提取物的制备

将同一份栀子花样品中所得到的 GJFEO 和 GJFFE 称重,得到两种提取物的质量比。按照此质量比配制得到栀子花复合提取物(*Gardenia jasminoides* flower compound extract, GJFCE)。

1.4.4 栀子花提取物对 HaCaT 细胞的毒性

取 GJFEO、GJFFE、GJFCE,用含 1% DMSO 的 DMEM 培养基配制稀释成不同浓度的药液。

取对数生长期的 HaCaT 细胞,稀释至 7×10^4 个/mL 后,每孔 100 μL 接种于 96 孔板内,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h;弃旧培养液,以不同浓度的 GJFEO (50.00 ~ 1 000.00 μg/mL)、GJFFE (50.00 ~ 1 000.00 μg/mL)、GJFCE (10.42 ~ 833.33 μg/mL) 给药,同时设置空白组、阳性组(SDS 浓度为 0.01 mg/mL)、调零组,每组设定 5 个复孔,孵育 24 h;弃旧培养液,每孔加入 100 μL 培养液,避光条件下,每孔再加入 20 μL MTT 溶液(0.05 mg/mL),孵育 4 h;弃去培养液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,用酶标仪在 570 nm 处检测各孔的吸光度 A,按式(2)计算各组细胞相对存活率,用 Graphpad Prism 7 软件处理数据并计算 IC₅₀。

$$\text{细胞相对存活率} = \frac{A_{\text{给药组}} - A_{\text{调零组}}}{A_{\text{空白组}} - A_{\text{调零组}}} \times 100\% \quad (2)$$

1.4.5 三种提取物对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用

按照以下步骤先分别比较 GJFEO、GJFFE 和 GJFCE 不同浓度下的抗氧化活性,再选出各自效果

最佳的浓度进行比较。

取对数生长期的 HaCaT 细胞, 稀释至 7×10^4 个/mL 后, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板内, 孵育 24 h; 弃去旧培养液, 以不同浓度的 GJFEO (12.50 ~ 100.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、GJFFE (20.00 ~ 320.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、GJFCE (2.09 ~ 133.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 给药, 同时设置空白组、阳性组 (Vc 浓度为 0.008 mg/mL)、模型组、调零组, 每组设定 5 个复孔, 孵育 24 h; 除空白组和调零组外, 每孔加 50 μL H_2O_2 (终浓度 0.8 mmol/L), 孵育 4 h; 弃去旧培养液, 每孔加入 100 μL 培养液, 避光条件下, 每孔再加入 20 μL MTT 溶液, 孵育 4 h; 弃去培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪在 570 nm 处检测各孔的吸光度 A, 按式 (2) 计算各组细胞相对存活率。

2 结果与分析

2.1 GJFEO 的提取工艺研究

2.1.1 萃取温度对 GJFEO 得率的影响

设置萃取压力为 20 MPa, 分离压力为 10 MPa, 在 30 ~ 45 $^{\circ}\text{C}$ 范围内考察萃取温度对栀子花精油得率的影响。由图 1A 可知, 精油得率随着萃取温度变化而变化, 当萃取温度在 30 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 之间时, 精油得率较高, 萃取温度为 40 $^{\circ}\text{C}$, 最高可达 0.81%; 此时萃取温度再升高, 精油得率反而下降。原因可能为恒定压力下, CO_2 密度随温度的升高而降低, 而温度对溶质的溶解度同样具有一定影响。这种影响程

度除实验外目前还不可预测^[21]。因此根据本研究结果, 确定 40 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳萃取温度。

2.1.2 萃取压力对 GJFEO 得率的影响

设置萃取温度为 45 $^{\circ}\text{C}$, 分离压力为 10 MPa, 在 15 ~ 35 MPa 范围内考察萃取压力对栀子花精油得率的影响。由图 1B 可知, 精油得率随萃取压力的增大有升高趋势, 当萃取压力为 30 MPa 时最高, 达到了 1.14%, 此时继续增大萃取压力, 精油得率则会开始下降, 原因可能是超临界状态下, 压力和温度对萃取效果产生的交互影响较大。大多数情况下, 随压力的增大, 脂溶性物质的提取率会相应升高, 但速率会减慢; 且溶出的物质种类会增加。在超临界流体萃取法中, 萃取的效果往往取决于萃取压力和温度的共同作用, 其中萃取压力产生的影响更大^[21]。根据本实验结果, 选择 30 MPa 为最佳萃取压力。

2.1.3 分离压力对 GJFEO 得率的影响

当流体状的 CO_2 携带精油进入分离釜时, 压力降低使得 CO_2 与精油分离。设置萃取温度为 45 $^{\circ}\text{C}$, 萃取压力为 20 MPa, 在 8 ~ 14 MPa 范围内考察分离压力对 GJFEO 得率的影响。由图 1C 可知, GJFEO 的得率随着分离压力的升高而升高。当分离压力为 14 MPa 时, 精油得率最高, 为 1.06%, 因此选择 14 MPa 为最佳分离压力。

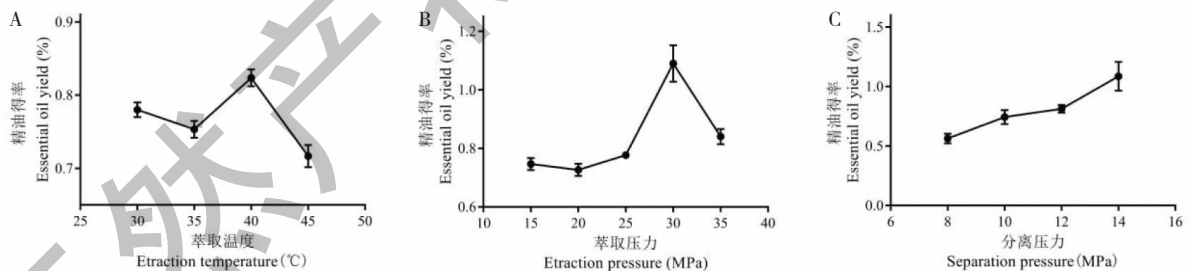


图 1 GJFEO 提取工艺的单因素考察

Fig. 1 Single factors investigation of GJFEO extraction process

2.1.4 正交试验结果

根据单因素考察的结果设置正交试验的因素水平, 对 GJFEO 的提取工艺进行进一步的优化。正交试验结果和方差分析如表 2、3 所示, 由此可知, 在本研究中, 萃取温度对栀子花精油得率的影响最大, 其次是萃取压力, 分离压力的影响最小。因此超临界流体萃取法提取 GJFEO 的最佳工艺根据实验结果选择萃取温度为 38 $^{\circ}\text{C}$, 萃取压力为 32 MPa, 分离压

力则选择能耗较少的 12 MPa。

2.2 GJFFE 的提取工艺研究

2.2.1 总黄酮标准曲线的绘制

在 507 nm 波长处测定不同浓度芦丁对照品溶液显色后的吸光度, 以吸光度为纵坐标 (Y), 浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 回归方程为 $Y = 13.487X - 0.1094$, $r = 0.9996$, 表明总黄酮在 20.02 ~ 50.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

表2 GJFEO 提取工艺的正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results of GJFEO extraction process

实验号 No.	因素 Factor				精油得率 Essential oil yield (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.03
2	1	2	2	2	0.98
3	1	3	3	3	1.11
4	2	1	2	3	1.06
5	2	2	3	1	0.84
6	2	3	1	2	1.07
7	3	1	3	2	0.79
8	3	2	1	3	0.73
9	3	3	2	1	0.80
K1	3.12	2.88	2.84	2.67	
K2	2.97	2.56	2.84	2.84	
K3	2.32	2.97	2.74	2.90	
Ssi	0.12	0.03	0.00	0.01	

表3 GJFEO 提取工艺正交试验方差分析

Table 3 The analysis of variance of orthogonal test of GJFEO extraction process

方差来源 Source	离均差平方和 Sum of squared deviations	自由度 df	方差 Variance	F 值 F value	P 值 P value
A	0.12	2.00	0.06	12.83	-
B	0.03	2.00	0.02	3.37	-
C	0.00	2.00	0.00	0.22	-
D(误差 Error)	0.01	2.00	0.00	-	-

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

2.2.2.2 乙醇浓度对 GJFFE 提取的影响

将提取完精油的栀子花分别用 50%、60%、70%、80% 的乙醇,按液料比 20:1 进行提取,每次 30 min,共提取 2 次,测定并计算总黄酮的提取率。结果如图 2A 所示,栀子花残渣中总黄酮的提取率随着乙醇浓度的升高而降低,说明较低浓度的乙醇有利于黄酮类成分的溶出。根据本实验结果,选择 50% 为最佳乙醇浓度。

2.2.2.3 液料比对 GJFFE 提取的影响

将提取完精油的栀子花用 60% 乙醇,分别按液料比 10:1、15:1、20:1、25:1 进行提取,每次 30 min,共提取 2 次,测定并计算总黄酮的提取率。结果如图 2B 所示,栀子花残渣中总黄酮的提取率随着液料比的增大而缓慢升高,说明在 10:1 ~ 25:1 的液料比范围内,液料比对栀子花残渣中总黄酮成分提取的影响不大。根据本实验结果,选择 25:1 为最佳液

料比。

2.2.2.4 提取时间对 GJFFE 提取的影响

将提取完精油的栀子花用 60% 乙醇,按液料比 20:1 进行提取,提取时间分别为每次 20、30、40、50 min,共提取 2 次,测定并计算总黄酮的提取率。结果如图 2C 所示,栀子花残渣中总黄酮的提取率随着每次提取时间的增长而升高,当提取时间为 50 min 时提取效果最好,此时总黄酮提取率 2.05%。因此选择 50 min 为每次的提取时间。

2.2.2.5 提取次数对 GJFFE 提取的影响

将提取完精油的栀子花分别用 60% 乙醇,按液料比 20:1 进行提取,每次 30 min,各提取 1、2、3 次,测定并计算总黄酮的提取率。结果如图 2D 所示,栀子花残渣中总黄酮的提取率随着提取次数的增大而升高,提取 2 次的提取率比提取 1 次显著升高,但当提取次数为 3 次时,升高幅度不大,为提高效率节

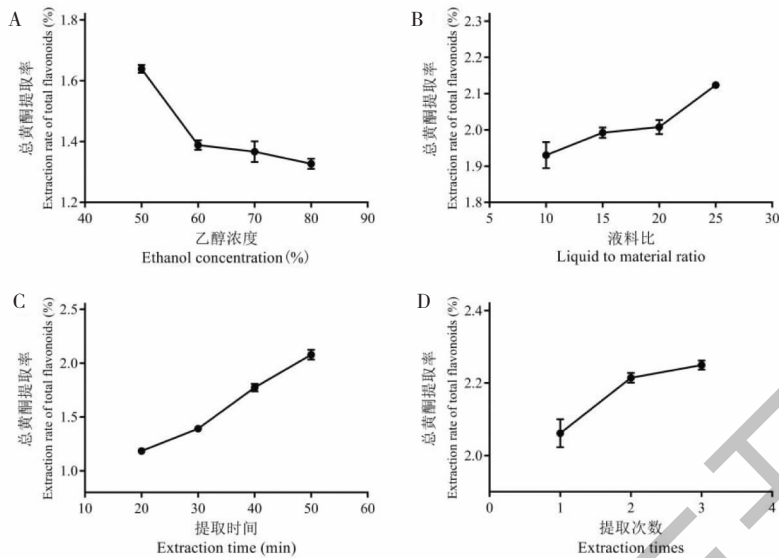


图2 GJFFE 提取工艺的单因素考察

Fig. 2 Single factors investigation of GJFFE extraction process

约能源,选择提取次数为2次。

2.3 栀子花复合提取物的制备

在同一份栀子花样品中提取得到的 GJFEO 质量为 1.07 g、GJFFE 质量为 23.79 g,质量比约为 1:24。将 GJFEO 和 GJFFE 按照此比例进行复配可以最大程度地利用两种提取物。因此从提高栀子花原料利用度的角度出发,将 GJFEO 和 GJFFE 按质量比 1:24 复配制得 GJFCE。

2.4 栀子花提取物对 HaCaT 细胞的毒性

角质形成细胞是人类表皮组织中最主要的细胞群,占 95%。HaCaT 细胞是研究外用药物制剂及化妆品对皮肤安全性及有效性时的首选细胞。SDS 是一种阴离子表面活性剂,运用于化妆品、日化用品中,对人体有微毒,常被用于测定皮肤刺激性的实验。以 SDS 为阳性药,采用 MTT 法分别测定给药后

的细胞相对存活率,以 IC_{50} 的大小来反映栀子花精油、栀子花黄酮提取物和复合提取物的对 HaCaT 细胞的毒性,结果见图 3。由结果可知,栀子花精油和黄酮提取物对皮肤细胞的毒性较小,但二者按比例复配后毒性显著增大。

2.5 栀子花提取物对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用

氧化损伤是公认的造成皮肤衰老的主要原因之一。 H_2O_2 是一种活性氧,具有强氧化性,使用 H_2O_2 作为诱导剂可以模拟出较为真实的皮肤氧化损伤情况。抗坏血酸(Vc)是常用的抗氧化剂,0.008 mg/mL 即可发挥作用,且作用较显著。首先考察不同浓度下的 GJFEO、GJFFE 的抗氧化活性,分别筛选出效果最好的浓度后和 GJFCE 进行比较,结果如图 4A、4B 所示。可知当浓度在 12.50 ~ 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 之间时,GJFEO 组和模型组相比具有显著的抗氧化作用 ($P < 0.01$),且效果优于 Vc 组;当浓度在 20.00 ~ 160.00 $\mu\text{g/mL}$ 之间时,GJFFE 组和模型组相比具有抗氧化作用,当浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,具有显著的抗氧化活性 ($P < 0.001$)且效果优于 Vc 组。细胞的相对存活率随着 GJFEO 和 GJFFE 的浓度升高而降低,原因是这两种提取物均具有一定的细胞毒性,浓度升高,细胞毒性也增大。由图 4C 可知,当浓度在 2.09 ~ 16.68 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,GJFCE 组和模型组相比具有显著的抗氧化活性 ($P < 0.05$),且优于 Vc 组。GJFCE 组发挥抗氧化活性的浓度明显低于

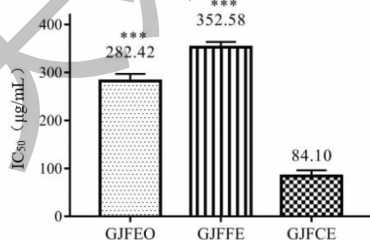


图3 栀子花不同提取物的细胞毒性比较

Fig. 3 Comparison of cytotoxicity of different extracts from *Gardenia jasminoides* flower

注:与 GJFCE 组比较,*** $P < 0.001$ 。Note: Compared with the GJFCE group, *** $P < 0.001$ 。

GJFEO 组和 GJFFE 组,当浓度为 4.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, GJFCE 组抗氧化活性最佳。

根据实验结果筛选, GJFEO、GJFFE 和 GJFCE 抗氧化效果最好的浓度分别为 25、20、4.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将这三种效果最好浓度的提取物进行比较,结果如图 4D 显示,4.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GJFCE 的抗氧化效果优于单一使用的 GJFEO 或 GJFFE ($P < 0.001$),且此时 GJFCE 中的 GJFEO、GJFFE 的占比浓度仅为 0.17、4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,远低于此组实验中两种单一提取物的浓度,因此表明将 GJFEO 和 GJFFE 按比例复配后可明显提高抗氧化活性。

实验结果表明, GJFEO、GJFFE 复配后细胞毒性增大,抗氧化作用明显增强,二者可能是产生了协同增效作用。Zhu 等^[16]对紫花地丁的相关研究同样发现其挥发油和黄酮类成分在清除 DPPH 自由基上能产生协同作用,但机制尚不明确。植物精油发挥抗氧化作用的机制主要为降低自由基水平和调控影响细胞凋亡的蛋白基因两个方面^[22],如薰衣草精

油^[23]、花椒精油^[24]可抑制或清除体内多种自由基、提高超氧化物歧化酶(SOD)活性、调节抑制细胞凋亡的多种蛋白基因等。植物黄酮抑制机体脂质过氧化的机制和精油相似^[25],如杨梅黄酮^[26]可以提高 SOD 活性,提高 IKBA mRNA 表达量、抑制 MMP-1 mRNA 水平的升高;葛根素^[27]对 UVA 损伤的 HaCaT 细胞的保护作用可能与激活 Keap1/Nrf2 信号通路上调抗氧化酶活性和下调 IL-1 β 、Fas 有关;补骨脂苷黄酮^[28]同样可能通过下调相关蛋白表达、提高抗氧化酶活性来保护皮肤细胞。综上所述,植物精油和黄酮都是通过提高抗氧化酶的活性、调控抑制细胞凋亡的蛋白基因等方式来发挥抗氧化作用,二者作用途径高度相似,可能是其复合时发挥协同增效作用的机制之一。GJFCE 的抗氧化活性增强的同时其细胞毒性也相应升高,但其产生明显抗氧化活性的浓度在其 IC_{50} 范围内,表明 GJFCE 在发挥抗氧化作用时对细胞的损伤仍然较小。

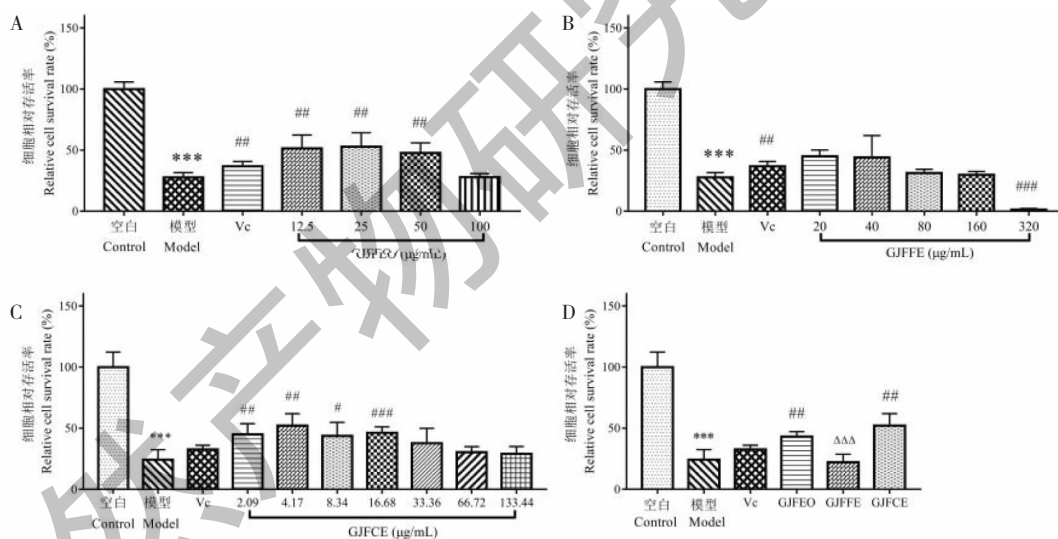


图 4 梔子花不同提取物抗 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞氧化损伤保护作用比较

Fig. 4 The protective effect of different extracts from *Gardenia jasminoides* flower against oxidative damage induced by H_2O_2 in HaCaT cells

注:与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组相比,与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;与 GJFCE 组相比, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

Note: Compared with the blank group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with the GJFCE group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

3 结论

本研究采用单因素和正交试验优化了 GJFEO 的最佳提取工艺为萃取温度 38 $^{\circ}\text{C}$ 、萃取压力 32 MPa、分离压力 12 MPa;采用单因素试验优化了 GJFFE 的最佳提取工艺为乙醇浓度 50%、液料比 25

:1、提取时间 50 min、共提取 2 次。两种工艺均条件简单、操作方便,一方面避免了精油传统提取过程中加热的操作,克服了蒸馏法精油香味不纯正、提取率低的缺陷;另一方面对提取完精油的残渣进行再次提取,能够获得其中的总黄酮成分,提高了梔子花原

料的利用率。

本研究的实验结果表明, GJFEO、GJFFE、GJFCE 均对 H_2O_2 损伤的 HaCaT 细胞有一定的保护作用, 且 GJFEO 与 GJFFE 复合后能够产生协同增效的作用, 提示 GJFCE 可作为一种高抗氧化性的梔子花提取物进行开发或深入的机制研究。根据实验中 GJFEO 和 GJFFE 在梔子花中所占质量比为 1:24, 本文中研究的 GJFCE 从提高原料利用率的角度考虑按照此比例进行复配, 后期可对不同比例复配的 GJFCE 进行进一步的活性评价以优选最佳比例。目前由于开发技术的薄弱, 梔子花资源存在大量浪费, 本研究的结果可为梔子花相关抗氧化化妆品及日化用品的开发提供技术支持和理论依据, 为中药非药用部位的综合利用提供借鉴及参考。

参考文献

- 1 State Administration of Traditional Chinese Herbal Editorial Board. The Chinese Materia Medica (中华本草) [M]. Shanghai: Publishing House of Shanghai Science and Technology, 1999: 427.
- 2 Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. Dictionary of Traditional Chinese Medicine (中药大辞典) [M]. Shanghai: Publishing House of Shanghai Science and Technology, 2006: 2244.
- 3 Lan M. Southern Yunnan Materia Medica (滇南本草) [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2013.
- 4 Sun SM. Qianjin Yi Fang (千金翼方) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1955.
- 5 Li SJ. Compendium of Materia Medica (本草纲目) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2017.
- 6 Gan XH, Zhao C, Zhao Y, et al. Study on chemical constituents and antioxidant activity of essential oil from flowers of *Gardenia jasminoides* [J]. Food Ind Technol (食品工业科技), 2013, 34(1): 77-79.
- 7 Feng N, Lu CS, Nan G, et al. Chemical constituents from flowers of *Gardenia jasminoides* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 200-203.
- 8 Ragasa CY, Pimenta LEN, Rideout JA. Iridoids from *Gardenia jasminoides* [J]. Nat Prod Res, 2007, 21: 1078-1084.
- 9 Zhang N, Luo M, He L, et al. Chemical composition of essential oil from flower of 'Shanzhizi' (*Gardenia jasminoides* Ellis) and involvement of serotonergic system in its anxiolytic effect [J]. Molecules, 2020, 25(20): 4702.
- 10 Liu CF. Study on anti-oxidation and antimicrobial activities of volatile components of 5 species flowers obtained from Qinba Mountain [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2011, 17(3): 103-107.
- 11 Ma X, Tian HF, Yue J, et al. Comparison of two common extraction methods of essential oil from sweet lavender [J]. Liaoning Agr Sci (辽宁农业科学), 2014(2): 35-37.
- 12 He TP, Chen YB, Yan JY, et al. Analysis and application of *Gardenia topnote* essential oil by supercritical CO_2 extraction [J]. Flavour Frag Cosmet (香料香精化妆品), 2011(1): 17-20.
- 13 Zhang YB, Lin HY, Li S, et al. Optimization of supercritical CO_2 fluid extraction of essential oil from jasmine buds by response surface methodology and effect of antioxidant activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 312: 1220-1229.
- 14 Liu X, Li W, Li CL, et al. Technology of extracting total flavonoids from flowers of *Gardenia jasminoides* var. *grandiflora* by microwave-assisted enzymatic method [J]. Hubei Agr Sci (湖北农业科学), 2016, 55: 6219-6223.
- 15 Jiang YH. Extraction and determination of total flavonoids from *Gardenia jasminoides* [J]. J Zhejiang Agr Sci (浙江农业科学), 2009(4): 839-841.
- 16 Zhu HQ, Wang Q, Li JN, et al. Antioxidant synergistic effects of volatile oils and flavonoids in *Rhizoctona purpurea* L [J]. J Ningxia Med Univ (宁夏医科大学学报), 2020, 42: 271-274.
- 17 Xie TW. Study on extraction and property analysis of flavonoids and essential oil from flowers of *Eriobotrya japonica* L. [D]. Xiamen: JiMei University (集美大学), 2012.
- 18 Zhang JC, Xie YF, Yu D, et al. Technological conditions and antioxidant activities of the flavonoid extracted from rose and rose residue [J]. Food Ind Technol (食品工业科技), 2014, 35(22): 226-230.
- 19 Wu H, Shao JJ, Zhang JH, et al. Ultrasonic-assisted comprehensive extraction of essential oil and total flavonoids from lavender [J]. J Jilin Agr Sci (江苏农业科学), 2018, 46(2): 142-145.
- 20 Zhang MM. Comparison of antioxidant capacities and regulation of gut microbiota of flavonoids [D]. Chongqing: Southwest University (西南大学), 2018.
- 21 Liu J. Optimization of supercritical fluid extraction process using response surface method and simulation [D]. Dalian: Dalian University of Technology (大连理工大学), 2013.
- 22 Zhong Y, Zheng Q, Hu PY, et al. Research progress on anti-aging pharmacological effects and mechanisms of plant essential oil [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 5584-5590.
- 23 Jin MH, Zhao Q. Research progress on the mechanism of lavender essential oil on skin photoaging [J]. J Southwest Med Univ (西南医科大学学报), 2017, 40(1): 94-96.